Ярцев Сергей Николаевич – заместитель директора ФГУП «Армавирская биофабрика», 352212, Краснодарский край, Новокубанский район, пос. Прогресс, ул. Мечникова, 11, тел. (86195) 2-11-15.

Ответственный за переписку с редакцией:

Болоцкий Иван Алексадрович доктор ветеринарных наук, заведую-щий лабораторией эпизоотологии Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института (КНИВИ), 350004, г. Краснодар, ул. 1-я Линия, 1, тел. (861) 221-54-77, e-mail: neovet2005@mail.ru

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

Синдрякова И.П., Моргунов С.Ю., Сальников Н.И., Цыбанов С.Ж., Колбасов Д.В.

(ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии)

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА МИКСОМЫ

Ключевые слова: ДНК вируса миксомы, полимеразная цепная реакция, рекомбинантная плазмида.

Миксоматоз - острое вирусное заболевание млекопитающих отряда зайцеобразных, характеризующееся серозно-гнойным конъюнктивитом, ринитом, появлением студенистых отеков в области головы, спины, ануса, наружных половых органов. Миксоматозом болеют домашние кролики независимо от возраста, породы и пола, а также европейские дикие и домашние кролики и зайцы. Возбудитель – ДНК содержащий вирус из рода Leporipoxvirus семейства Poxviridae [1].

В распространении вируса важную роль играют кровососущие насекомые: комары, блохи и вши, паразитирующие на кроликах. Некоторые исследователи считают, что насекомые передают инфекцию механически, а не трансмиссивно. Предполагают, что комары служат резервуаром вируса в природе, также хорошо известны другие резервуары этого вируса - кроличьи блохи и почва кроличьих нор. Замечено, что в годы с обильным выпадением осадков, когда создаются более благоприятные условия для интенсивного развития насекомых, вспышки миксоматоза протекают более интенсивно и на обширных территориях. [2]

Инкубационный период заболевания колеблется в пределах 2-28 суток (в среднем 3-11 суток). Миксоматоз может протекать: сверхостро; остро (классическая, или отечная, форма) - летальность достигает 100%; подостро (нодулярная, или узелковая, форма) –3-4 недели, с летальностью 70-80%: хронически (атипичная форма) - через 3-4 недели наступает выздоровление. В последние годы отмечена эволюция вируса миксомы кроликов.

Лабораторные диагностические исследования проводят путем гистологического изучения инфильтратов, постановки биопробы на кроликах. Для обнаружения у кроликов антител к возбудителю применяют серологические методы, такие как РИФ (реакция иммунофлуоресценции), РСК (реакция связывания комплимента), РДП (реакция диффузной преципитации), РН (реакция нейтрализации), ИФА (иммуноферментный анализ). Дифференцируют заболевание в основном от фиброматоза и стафилоккоза[1]. Но биопроба занимает в среднем от 7-10 дней, также как и гистологический анализ. К тому же эти методы являются постмортальными средствами диагностики.

Одним из современных методов диагностики инфекционных заболеваний является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Универсальность, высокая чувствительность и относительная простота исполнения сделали ПЦР незаменимой для решения различных задач клинической диагностики, таких как прямое обнаружение и идентификация возбудителей заболеваний, а также молекулярное типирование. Отечественные ПЦР-тест-системы для идентификации ДНК вируса миксомы не разработаны.

Цель настоящей работы — разработка

тест-системы на основе ПЦР для диагностики миксоматоза.

Для решения поставленной задачи были использованы следующие подходы: поиск и выбор консервативных участков генов в полногеномной нуклеотидной последовательности ДНК вирусов миксомы; подбор праймеров к выбранной консервативной нуклеотидной последовательности и оптимизация условий проведения ПЦР.

Материалы и методы

Материалы для исследования: образцы крови и гомогенаты тканей кроликов, зараженных штаммом МР вируса миксомы, а также препараты музейных штаммов из коллекции ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии: МР (вирулентный), Микс 98 (адаптированный к перевиваемой культуре клеток CV-1), Лепоривак (адаптированный к перевиваемой культуре клеток РК-13) и производственный штамм В-82.

Сравнительный анализ и выравнивание нуклеотидных по-следовательностей были проведены с использованием пакета программ BioEditSequenseAlignmentEditor (version 7.0.5.2 Copyright 1997—2005).

Олигонуклеотиды - праймеры подбирали с помощью программы Oligo 4.0.

Экстракция ДНК. Экстракцию ДНК из материалов проводили методом сорбции нуклеиновой кислоты на силикагеле при помощи набора для выделения нуклеиновых кислот производства ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии (г. Покров), согласно инструкции производителя.

Для ПЦР-амплификации использовали 5 мкл ДНК, реакцию проводили в 25 мкл раствора, содержащего 4мкл 5х ПЦР буфера с 1,5мМ содержанием Mg^{++}, 1,5мкл 25 мМ $MgCl_2$, 1мкл 10Пм каждого праймера, 0,2 мМ каждого дНТФ и 0,15 ед. Taq ДНК-полимеразы. (Праймеры синтезировали в НПО «Литех» (Москва)).

В качестве положительного контроля использовали сконструированную нами рекомбинантную плазмиду pGEM – TM022L. Для этого амплифицировали фрагмент (550 п.о.) гена M022L вируса миксомы, штамм МР. Постановку реакции осуществляли на термоциклере PalmCycler (CorbettResearch, Австралия). Полученный фрагмент встраивали в плазмидный вектор pGEM –TEasy (Promega, США) с помощью прилагаемого набора в соответствии с инструкцией изготовителя. Методом электропорации трансформировали лигазной смесью компетентные клетки E. coli, штамм Top 10 (Invitrogen, США). Трансформированные клетки высевали на агар, содержащий ампициллин (100 мкг/мл), X-Gal (0,5 мМ) и IPTG (80мкг/мл). После 8-10 ч инкубации при температуре 37°С проводили первичный скрининг клонов по цвету колоний (колонии белого цвета содержат рекомбинантную плазмиду, синего цвета – не содержат). Отобранные колонии высевали в среду SOB и инкубировали при перемешивании до достижения средней логарифмической фазы роста. Методом щелочного лизиса из 1,5 -2 мл бактериальной культуры каждого клона выделяли плазмидную ДНК, которую затем проверяли методом ПЦР на наличие встройки фрагмента генома вируса миксомы[4].

Подбор оптимальной концентрации плазмиды в качестве матрицы для постановки ПЦР, и определение чувствительности реакции проводили, с использованием серии десятикратных разведений.

Отрицательным контролем служила дистиллированная вода. ПЦР проводили на термоциклере PalmCycler (CorbettResearch, Австралия)

Продукты ПЦР анализировали электрофоретически в 2% агарозном геле с 0,5 мкг/мл этидиум бромида. Электрофорез проводили 20 мин при 50 А, 10 V/см. Продукты амплификации визуализировали на трансиллюминаторе при длине волны УФ 280 нм. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждалась ее положением (размером) по отношению к маркерным фрагментам (маркер молекулярных весов «DNA Ledder100-3000 bp», Axygen Biosciences).

Результаты и обсуждение

В базе данных GenBank, был проведен поиск известных полногеномных нуклеотидных последовательностей вируса миксомы.

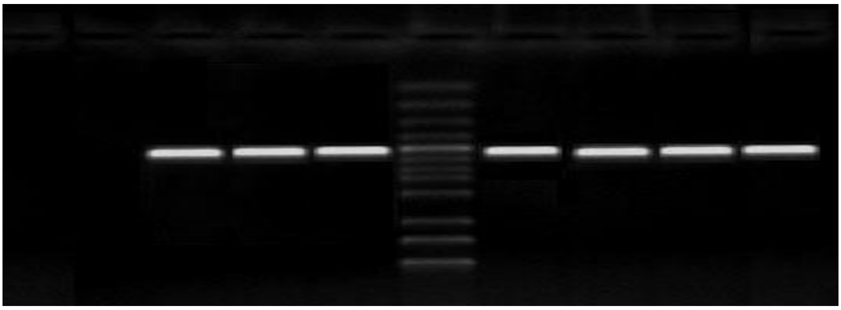
На основе проведенного анализа для подбора праймеров был выбран фрагмент гена M022L, кодирующий оболочечный белок, ответственный за упаковку вирусной ДНК. Данный фрагмент гена содержит длинные гомологичные участки и является наиболее консервативным[5].

С помощью программы Oligo 4.0 были подобраны праймеры к данному участку гена. Поиск был проведен по следующему алгоритму: длина праймеров 20 ± 2 пары оснований, длина ампликона 200— 600 пар оснований. В результате поиска в последовательности гена M022L указанным характеристикам соответствовало несколько олигонуклеотидных сиквенсов. Однако дальнейший анализ олигонуклеотидов на образование шпилек, димеров, кроссдиме-

ров и ложный отжиг выявил наиболее стабильную пару праймеров следующей последовательности — левый праймер (F): 5›-gggggaatctgataaaaac-З›; правый праймер (R) : 5›-gccaaacgatacatccac-3›; амплифицирующих участок длиной 550 п. о. Проверка последовательности праймеров на их специфичность с помощью программы BLAST показала 100% гомологию к гену M022L.

Оптимизацию ПЦР проводили по следующим параметрам: температуру отжига подбирали в диапазоне 50°С - 66° С с шагом в 4°. Электрофореграммы продуктов ПЦР представлены на рис. 1.

В процессе оптимизации температурных режимов реакции было установлено, что пара праймеров на область гена, кодирующего оболочечный белок (M022L), позволила не только идентифицировать исследуемые штаммы вируса миксомы, но и дифференцировать вакцинный штамм В-82.



отжиг при 62˚ С — отжиг при 50˚С

К- 1 2 3 4 М 1 2 3 4

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР

Треки: 1- ДНК из культурального материала(ФЭК) , содержащего штамм В-82 вируса миксомы кроликов; **2**- ДНК из лиофилизированного материала, содержащего штамм МР вируса миксомы кроликов; **3**- ДНК из культурального материала (RK-13/2-03) содержащего штамм Лепоривак вируса миксомы кроликов; **4**- ДНК из лиофилизированного культурального материала (CV-1), содержащего штамм Микс-98 вируса миксомы; М- - маркер молекулярной массы GeneRuler 100 bp Ladder DNA marker (100bp-3000bp) (Axygen Biosciences); К- отрицательный контроль.

Для того чтобы уменьшить возможность неспецифического связывания праймеров с ДНК мишенью, были выбраны следующие условия проведе-ния ПЦР: концентрация Mg^2+ 4мМ, температурный режим 95° С - 3 мин – 1 цикл; далее 35 циклов: 95°С - 16 сек, 62°С - 26 сек, 72°С - 26 сек. Тест-систему апробировали на препаратах от экспериментально зараженных кроликов. Материалом для исследований служили пробы органов и кровь, отобранные в разные сроки после заражения восприимчивых кроликов вирусом миксомы (штамм МР).

Краткая схема эксперимента:

1.Препарат нативного материала (10% суспензия подкожной клетчатки кроликов зараженных штаммом МР), вводили кроликам подкожно в область лопатки в объеме 1,0см^3.

2.Ежедневно, в течение 9 суток проводили отбор проб крови зараженных кроликов, выделяли ДНК вируса, проводили ПЦР-анализ с помощью специфических праймеров при двух температурных режимах (+50^{0}С и +62^{0}С) и анализировали амплифицированные фрагменты методом электрофоретического разделения в 2% агарозном геле. Данные эксперимента приведены в табл.1.

Как видно из таблицы разработанная нами тест-система на основе ПЦР позволяет идентифицировать различные штаммы вируса миксомы кроликов, дифференцировать вакцинный штамм В-82 и выявлять ДНК вируса в крови инфицированных животных начиная с 3 суток. Дифференциация вакцинного штамма В-82 от других штаммов основана на различных температурах отжига праймеров.

Таблица 1

Результаты проведенной работы

<table>
<tr><td rowspan="3">Исследуемый материал</td><td colspan="12">Результат ПЦР</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Отжиг праймеров (t =+50^0 C)</td><td rowspan="2">Отжиг праймеров (t =+62^0 C)</td><td colspan="10">Сутки</td></tr>
<tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>5</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td></tr>
<tr><td>Кровь</td><td>+</td><td>+</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td><td>+</td></tr>
<tr><td>Культуральный штамм «МР»</td><td>+</td><td>+</td><td rowspan="4" colspan="5">Без клиники</td><td rowspan="4" colspan="5">С клиникой</td></tr>
<tr><td>Культуральный штамм «Микс 98»</td><td>+</td><td>+</td></tr>
<tr><td>Культуральный штамм «Лепоривак»</td><td>+</td><td>+</td></tr>
<tr><td>Культуральный штамм «В-82»</td><td>+</td><td>-</td></tr>
<tr><td>Контрольный образец</td><td>-</td><td>-</td><td colspan="5">-</td><td colspan="5">-</td></tr>
</table>

Рекомбинантную плазмиду для положительного контроля получили путем скрининга клеточных культур, несущих фрагмент гена M022L вируса миксомы; в результате было отобрано 10 клонов. С целью проверки встройки участка генома вируса миксомы в вектор pGEM –TEasy была проведена ПЦР. Специфический фрагмент выявляли на уровне 550 п. о., что соответствует искомому размеру ПЦР - продукта (Рис. 2).

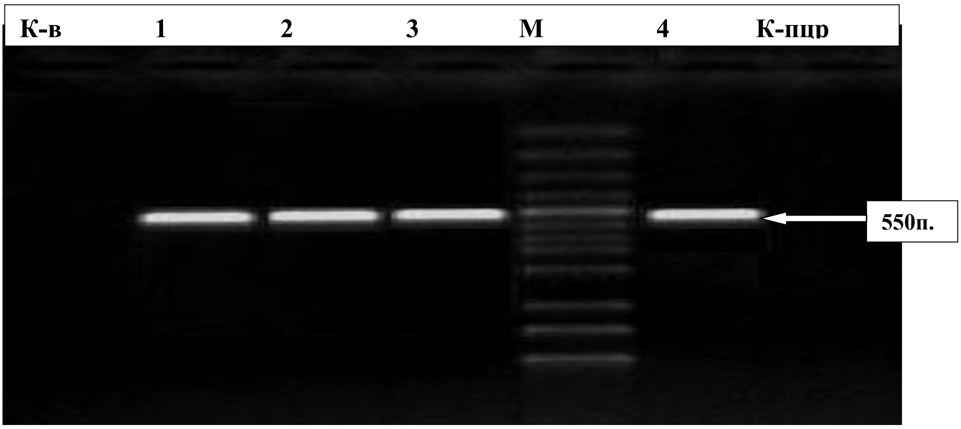


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР.

Треки: К-в- отрицательный контроль выделения; 1- ДНК из органного вируссодержащего материала от кроликов, зараженных штаммом МР вируса миксомы; 2- ДНК из культурального материала (ФЭК), содержащего штамм В-82 вируса миксомы; 3- ДНК из лиофилизированного материала, содержащего штамм МР вируса миксомы; М - маркер молекулярной массы GeneRuler 100 bp Ladder DNA marker (100bp-3000bp) (Axygen Biosciences); 4- рекомбинантная плазмида; К-пцр- отрицательный контроль ПЦР.

Затем было проведено сравнение стабильности геномного и плазмидного контролей в условиях использования набора. Для этого проводили их 10-кратное замораживание/оттаивание при применении компонентов «Тест–системы….». В резуль-

тате электрофореза наблюдали сильную деградацию молекул ДНК вируса миксомы. Плазмида, напротив, выдерживала многократное замораживание/оттаивание, что также является одним из преимуществ ее использования в наборах в качестве положительного контроля ПЦР.

В ходе определения оптимальной концентрации плазмиды в качестве положительного контроля было установлено, что при использовании в качестве матрицы геномной ДНК вируса миксомы (штамм МР, инфекционная активность 5,0 $lgLD_{50/см3}$) искомый амплифицированный фрагмент выявляли в разведении $1:10^4$(1,0 $lgLD_{50/см3}$), а с использованием рекомбинантной плазмиды (исходная концентрация $3*10^{10}$ копий молекул ДНК на мкл) - в разведении $1:10^8$ (300 копий молекул ДНК на мкл) (рис.3). Таким образом, для проведения анализа с

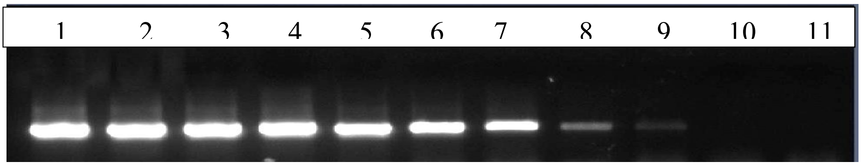


Рис.3.Электрофореграмма результатов ПЦР с использованием в качестве матрицы разведений плазмиды.
Треки : 1- ДНК исходной плазмиды, 2- 11 – рекомбинантная плазмидная ДНК в разведениях с $1:10^1$ до$1:10^{10}$ соответственно.

помощью “Тест-системы …” необходимо использовать плазмиду в разведении $1:10^4$ или $1:10^5$.

Заключение

Разработанная нами тест-система показала свою диагностическую эффективность, свидетельствующую о перспективности использования ее для выявления вируса миксомы кроликов.

Метод ПЦР может быть использован для дифференциации животных привитых вакцинным штаммом В-82 от животных инфицированных вирулентным полевым изолятом при различных температурах отжига праймеров.

При детекции продуктов амплификации с помощью электрофоретического разделения в 2% агарозном геле фрагмент расчетного размера обнаруживали в пробах материала, содержащих вирус миксомы, и в пробе, содержащей плазмидный положительный контроль.

Таким образом, диагностические праймеры комплементарны соответствующим участкам созданной плазмиды, что позволяет использовать ее в качестве положительного контроля в разработанной «Тест-системе для выявления ДНК вируса миксомы методом полимеразной цепной реакции».

Резюме: Путем сравнительного выравнивания нуклеотидных последовательностей вируса миксомы рассчитаны праймеры к консервативному участку гена M022L. Определены и оптимизированы условия проведения ПЦР, показана афинность праймеров для генома штаммов вируса миксомы. Разработана ПЦР тест-система для выявления ДНК вируса миксомы.

SUMMARY

The oligonucleotide primers for conserve regions of myxoma virus M022L gene were developed. Identified and optimized conditions for PCR, showed the affinity primers for genome strains of myxoma viruses. A PCR diagnostic kit for detection of myxoma viruses was developed.

Keywords: DNA of myxoma virus, polymerase chain reaction, recombinant plasmid

Литература

1.Коломыцев, А.А., Бурдинская О.Н., Миксоматоз кроликов // Кролиководство и звероводство.-2005.-№6.-с. 24.

2. Nash, P., Barrett, J., Cao, J. X., Hota-Mitchell, S., Lalani, A. S., Everett, H., Xu, X. M., Robichaud, J., Hnatiuk, S., Ainslie, C., Seet, B. T. &McFadden, G. (1999). Immunomodulation by viruses : the myxomavirus story. Immunological Reviews 168 , 103-120.

3. Molecular Cloning. A laboratory Manual / T.Maniatis, E.F. Fritsch, S. Sambrooks // Cold Spring Harbor Laboratory. - Cold Spring Harbor, New York, 2006.

4. Molecular Cloning. A loboratory Manual/J. Sambrook, D.W.Russell// Cold Spring Harbor

Laboratory. - Cold Spring Harbor, New York, 2001. P.132-134.

5. A. Muller, E. Silva, J. Abrantes, P.J. Esteves, P.G. Ferreira, J.C. Carvalheira, N. Nowotny, G. Thompson. // Partial sequencing of recent Portuguese myxoma virus field isolates exhibits a high degree of genetic stability.- Veterinary Microbiology 2010, Jan 6,140(1-2) P. 160-166

Контактная информации об авторах для переписки

Синдрякова И.П., аспирант, **Моргунов С.Ю.**, аспирант, **Сальников Н.И.**, аспирант, **Цыбанов С.Ж.**, д.б.н., профессор, **Колбасов Д.В.**, д.в.н., профессор

Адрес для переписки: Синдрякова Ирина Петровна Yasnen-ko@mail.ru 89051479854

УДК 663:619:576.8

Чубенко Н.В., Малышева Л.А.

(Донской ГАУ)

ПРИМЕНЕНИЕ УСКОРЕННЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Ключевые слова: Пищевые продукты, патогенные микроорганизмы, классические и ускоренные методы анализа, сравнительная характеристика.

Введение.

Проблема выявления пищевых зоонозов, в том числе Salmonella и Listeria monocytogenes в сырье и готовой продукции по-прежнему остается актуальной. Статистика заболеваний людей пищевого происхождения, приведенная ВОЗ, регистрирует значительное увеличение в Европе заболеваний обусловленных потреблением продуктов питания, контаминированных сальмонеллами и листериями [6].

Возникновение пищевого сальмонеллеза и листериоза связано с употреблением продуктов питания (мясо и мясная продукция, молоко и молочная продукция, рыба, рыбная продукция, нерыбные объекты промысла, яйцо и яйцепродукты) прошедших недостаточную термическую обработку или их обсеменением патогенными микроорганизмами в процессе производства и хранения.

В Российской Федерации с 2002 года в СанПиН 2.3.2.1078-01 определен перечень пищевых продуктов, которые контролируются на наличие сальмонелл и листерий. Разработаны ГОСТ Р 51921-2002 и ГОСТ Р 52814-2007 в соответствии с которыми, должны проводиться исследования пищевой продукции на наличие вышеуказанных микроорганизмов [1].

Исследование продукции на наличие Salmonella и L. monocytogenes предусматривает четыре этапа: неселективное и селективное обогащение, выявление и подтверждение и имеет ряд особенностей. Одна из которых состоит в том, что в пищевых продуктах микроорганизмы родов Salmonella и Listeria находятся в смешанной форме с другими микроорганизмами и для их выявления необходимо применение селективных сред обогащения, подавляющих рост сопутствующей микрофлоры. Другая особенность заключается в выделении непатогенных для человека видов листерий, обладающих сходными с L. monocytogenes культурально-морфологическими свойствами. Например, L. innocua является наиболее часто сопутствующим микроорганизмом L. monocytogenes. В связи с этим необходимо использовать строго специфические среды и методы выявления и идентификации патогенного для человека вида листерий [7].

Окончательные результаты с использованием традиционных (классических методов микробиологических исследований пищевой продукции на наличие сальмонелл при отрицательном результате анализа могут быть получены через 4 суток, а при положительном на 5-е и 8-е (14-е) сутки соответственно. Это указывает на то, что результаты испытаний с использованием традиционных методов контроля, получают только тогда, когда продук-